

## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Penelitian**

Dalam penelitian ini menggunakan rancangan *experimental* secara *in vivo* yang dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dalam rancangan ini, menggunakan 4 kelompok penelitian dimana seluruh kelompok *experimental* diberi perlakuan.. Pada keempat kelompok diawali dengan pretest, dan setelah pemberian perlakuan diadakan pengukuran kembali. Subjek yang dipilih pada rancangan penelitian ini menggunakan teknik acak. Sebagai kontrol menggunakan hasil pemeriksaan sebelum diberikan perlakuan (H0)

Perlakuan / intervensi dalam penelitian ini dilakukan pada WUS yang mengalami *bacterial vaginosis* yang diberikan antibiotik *Metronidazole*, *Glucomannan Hydrolisates* (GMH) + antibiotik *Metronidaloze*, *Balance Activ* (BA) dan kombinasi *GMH + BA*. Pemberian GMH dan BA pervaginam (*suppositoria*) dan antibiotik *Metronidazole* per oral. Sedangkan fenomena yang terjadi akibat adanya perlakuan / intervensi tersebut diberikan pada penelitian ini adalah kadar sitokin IL-23 dan IL-22.

#### **4.2 Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan keseluruhan subyek penelitian. Apabila seseorang ingin meneliti semua elemen yang ada dalam wilayah penelitian, maka penelitiannya merupakan penelitian populasi atau studi populasi atau studi sensus (Sabar, 2007). Dalam penelitian ini menjadikan wanita usia subur yang mengalami *Bacterial Vaginosis* sebagai sampel penelitian dengan kriteria tertentu.

#### 4.2.1 Besar Sampel Penelitian

Menurut Hanafiah (2011), penghitungan besarnya pengulangan pemeriksaan ditentukan berdasarkan rumus :

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

t = jumlah perlakuan

r = jumlah pengulangan

penelitian ini menetapkan 4 kelompok, yaitu: kelompok antibiotik Metronidazole, GMH+Antibiotik, kelompok BA, dan kelompok kombinasi GMH+BA. Sehingga sampel yang diperlukan adalah :

$$(4-1) (r-1) \geq 15$$

$$3 (r - 1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15+3$$

$$r \geq 18 : 3$$

$$r \geq 6 \text{ orang sampel/ kelompok}$$

Jumlah sampel secara keseluruhan adalah jumlah perlakuan dikalikan jumlah pengulangan  $6 \times 4 = 24$  , sehingga dalam penelitian ini menggunakan 24 orang responden.

#### 4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini yaitu wanita usia subur yang mengalami BV di RSUD dr. Iskak Tulungagung. Pengambilan sampel di sesuaikan dengan kriteria inklusi dan eksklusi.

##### a. Kriteria Inklusi

- 1) Wanita usia 20-49 tahun
- 2) Wanita yang telah menikah atau sudah pernah berhubungan seksual
- 3) Wanita dengan siklus menstruasi yang teratur

- 4) Wanita dengan maksimal pada hari ke 7 setelah menstruasi
- 5) Wanita yang mengalami keputihan encer homogen yang berwarna putih keabu-abuan
- 6) Wanita dengan hasil gram (+) *Bacterial Vaginosis*
- 7) Wanita dengan riwayat pasangan seksual tetap
- 8) Wanita dengan pH vagina ( $> 4.5$ )
- 9) Wanita dengan adanya "*clue cells*" atau bakteri gram negative lain pada pengujian dibawah mikroskop dari sampel yang diambil dari vagina (swab)
- 10) Wanita dengan "*fishy odor*"
- 11) Wanita yang bersedia menjadi responden penelitian
- 12) Wanita dengan persetujuan pasangan (suami)

b. Kriteria Eksklusi

- 1) Wanita yang sedang menstruasi, hamil dan menyusui
- 2) Wanita dengan hasil (+) bakteri *Gonococcus* maupun *E. Coli* dengan pemeriksaan awal *direct smear*
- 3) Wanita menggunakan produk probiotik atau prebiotik di luar rancangan penelitian
- 4) Wanita dengan penggunaan antibiotik jenis apapun untuk pengobatan penyakit lainnya
- 5) Wanita dengan kontrasepsi hormonal (suntik, pil, implant)
- 6) Wanita dengan penggunaan sabun pembersihewanitaan
- 7) Wanita dengan penyakit sistemik akut (Diabetes Mellitus)
- 8) Wanita dengan *Immuno-compromise* dan penyakit yang berhubungan dengan sistem imunitas tubuh (HIV/ AIDS, SLE)
- 9) Wanita yang tidak dapat mematuhi peraturan penelitian
- 10) Wanita dengan *Bacterial Vaginosis* yang tidak bersedia berpartisipasi

#### 4.2.3 Kelompok Perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok penelitian masing-masing kelompok terdiri dari 7 Pasien :

a. Kelompok 1 pemberian antibiotik Metronidazole

Pasien diberikan *Metronidazole* dengan dosis 500 mg, 2x sehari selama 7 hari pemberian.

b. Kelompok 2 *Glucomannan Hydrolysates* (GMH) + Antibiotik

Pasien menggunakan pessaries berisi *Glucomannan Hydrolysates* (GMH) dikombinasikan dengan Antibiotik Metronidazole 500mg, Pasien menggunakan pessaries GMH selama 21 hari dan profil mikrobiologi vagina (swab) diuji pada hari ke-0 (sebelum perlakuan pessary), hari ke-11 dan hari ke-22. Pessaries GMH (300mg) digunakan 3 kali seminggu pada saat sebelum tidur. Untuk Antibiotik diminum selama 7 hari berturut-turut.

c. Kelompok 3 *Balance Activ* (BA)

Pasien hanya di berikan terapi *Balance Activ* (BA) bentuk sediaan gel dengan dosis 5 mL perhari. Produk asam laktat komersial digunakan sesuai petunjuk pabrik pembuatnya. Jadwal penggunaan 1 x sehari selama 7 hari berturut-turut.

d. Kelompok 4 *Glucomannan Hydrolysates* (GMH) + *Balance Activ* (BA)

Pasien menggunakan pessaries berisi *Glucomannan Hydrolysates* (GMH) dikombinasikan dengan *Balance Activ* (BA), Pasien menggunakan pessaries GMH (300 mg) + BA (5 mL) selama 21 hari dan profil mikrobiologi vagina (swab) diuji pada hari ke-0 (sebelum perlakuan pessary), hari ke-11 dan hari ke-22. Pessaries GMH (300mg) dan BA digunakan secara pervaginam dalam waktu bersamaan 3 kali seminggu pada saat sebelum tidur..

#### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel adalah suatu atribut atau sifat yang dimiliki oleh obyek dan memiliki variasi tertentu untuk diterapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2012)

a. Variabel tergantung (dependent)

Variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu IL-22 dan IL-23

b. Variabel bebas (independent)

Variabel independent dalam penelitian ini adalah Antibiotik, *Glucomannan Hydrolysates* (GMH)+Antibiotik, *Balance Activ* (BA), dan Kombinasi GMH+BA

#### 4.4 Definisi Operasional

Definisi operasional menjelaskan semua variabel dan istilah yang akan digunakan dalam penelitian secara operasional, sehingga mempermudah pembaca/penguji dalam mengartikan makna penelitian (Nursalam, 2013).

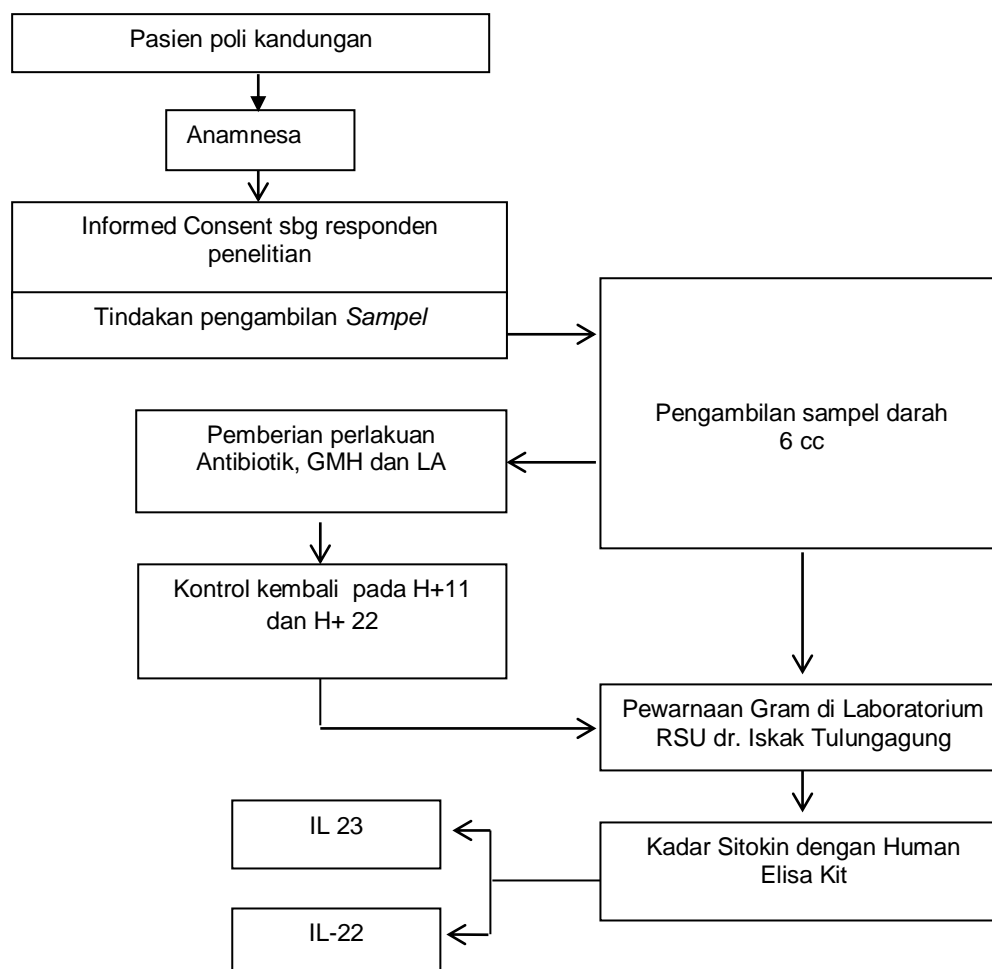
**Tabel 3.1 Definisi Operasional Penelitian**

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur/ satuan	Skala
1	Variabel Independen Antibiotik Metronidazole	Metode lama untuk mengatasi BV dengan menggunakan antibiotik Metronidazole peroral dengan dosis 500mg, 2 x sehari selama 3 hari berturut- turun	mg	Ratio
2	Variabel Independen <i>Glucomannan Hydrolysates</i> (GMH)	Prebiotik GMH yang berbentuk <i>pessaries</i> berisi enzim mananase dari tanaman konjac (sebagai polisakarida) yang digunakan sebagai anti tumor, cytothesis, imunoregulasi, dan prebiotik (Sigres dan Sutrisno, 2015), menutrisi pertumbuhan bakteri <i>Lactobacillus</i> guna menekan pertumbuhan pathogen, dengan diproduksinya substansi anti-mikrobal: asam, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dan bacteriocin (Tester, 2011). Penggunaan <i>pessaries</i> pada malam hari menjelang tidur, <i>pessaries</i> dimasukkan pervaginam tanpa membuka kemasan kapsul. Dosis penggunaan 300mg/ kapsul./ hari.	mg	Ratio

3	Variabel Independen Balance Activ (BA)	Lactic acid yang dikemas didalam tube, dapat menghasilkan senyawa metabolit seperti asam organik (asam laktat dan asam asetat), karbon dioksida (CO <sub>2</sub> ) (Hendriani, 2009), dan juga <i>bacteriocyn</i> yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain (Pieter, 2005) sehingga dapat menunjang keseimbangan flora normal di genitalia wanita, menjadikan suasana lingkungan vagina menjadi asam, menekan perkembangan pathogen. BV gel diproduksi oleh Rolf Kullgren AB, Agatan 4, PO-BOX 123 SE-646 22, Swedia. dan didistribusi oleh BBI Healthcare, Ltd. Penggunaan pada malam hari menjelang tidur, dengan dosis 5cc dimasukkan pervaginam .	mL	Ratio
4	Variabel Dependen Interleukin 23	Interleukin 23 (IL – 23) merupakan anggota dari IL 12, adalah sitokin heterodimeric yang terdiri dari subunit IL – 12p40 dan subunit p19 yang baru (Kleinschek <i>et.al</i> , 2006), IL-23 dikeluarkan oleh APC untuk merangsang perkembangan sel T naïve CD4+ menjadi Th17 untuk memproduksi IL – 17, IL21, dan IL-22 (Abbas, 2012)	Human ELISA kit	Ratio
5	Variabel Dependen Interleukin 22	Interleukin 22 (IL–22) merupakan sitokin yang memodulasi respon jaringan. Melalui aktivasi kaskade sinyal STAT3, sitokin yang menginduksi proliferasi dan jalur anti-apoptosis, serta molekul antimikroba yang membantu mencegah kerusakan jaringan dan membantu dalam perbaikan (Abbas, 2012)	Human ELISA kit	Ratio
6	Variabel Kendali Bacterial Vaginosis non spesifik	Bacterial Vaginosis (BV) adalah infeksi polymicrobial ditandai oleh kurangnya H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> yang diproduksi <i>Lactobacilli</i> dan pertumbuhan berlebih dari organisme anaerob fakultatif seperti <i>Gardnerella vaginalis</i> dan bakteri gram negative lainnya (Donders, 2010; O’Hanlon, 2011)	Nugent Score	-
7	Variabel Moderator Wanita Usia Subur	Wanita usia subur (usia 20-35) yang sudah menikah atau sudah pernah melakukan hubungan seksual (DepKes,2003), datang dengan keluhan keputihan, mengeluarkan cairan per vaginam berbau dan gatal tanpa disertai tanda gejala penyakit menular seksual.	-	-

## 4.5 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

### 4.5.1 Prosedur Penelitian



**Gambar 4.1 Bagan Prosedur Penelitian**

### 4.5.2 Pengumpulan Data

- Pemeriksaan Kadar IL-23 pada hasil sampel darah WUS dengan BV positif pada hari ke – 0, H+11 dan H+22 setelah perlakuan dengan menggunakan human Elisa kit
- Pemeriksaan Kadar IL-22 pada hasil sampel darah WUS dengan BV positif pada hari ke – 0, H+11 dan H+22 setelah perlakuan dengan menggunakan human Elisa kit

#### **4.6 Tempat dan Waktu Penelitian**

##### **4.6.1 Tempat Penelitian**

- a. Pengambilan Sampel dilakukan di Poli Kandungan RSUD. dr. Iskak Tulungagung
- b. Pemeriksaan sampel darah untuk melihat kadar sitokin IL-23 dan IL-22 dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

##### **4.6.2 Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan sejak tanggal 12 Januari hingga 26 Juli 2017

#### **4.7 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.7.1 Alat Penelitian**

Alat untuk Pemeriksaan Sitokin: *Human Elisa Kit*, tabung centrifuse (1,5 ml, 15ml, 50ml), vacutainer BD EDTA, Blue tip, Yellow tip, White tip, Spuit (1cc, 5cc), handscoen, Etiket, Plester (untuk Fiksasi), Tabung Anaerob, ice box, alat tulis.

##### **4.7.2 Bahan Penelitian**

- a. Sampel plasma darah WUS dengan BV pada H0 sebelum diberikan intervensi Antibiotik Metronidazole, GMH+AB, BA, dan Kombinasi GMH+BA
- b. Sampel plasma darah WUS dengan BV pada H+11 selama diberikan intervensi Antibiotik Metronidazole, GMH+AB, BA, dan Kombinasi GMH+BA
- c. Sampel plasma darah WUS dengan BV pada H+22 setelah diberikan intervensi Antibiotik Metronidazole, GMH+AB, BA, dan Kombinasi GMH+BA



#### 4.8 Prosedur Pemeriksaan

##### 4.8.1 Pemeriksaan Kadar IL-23

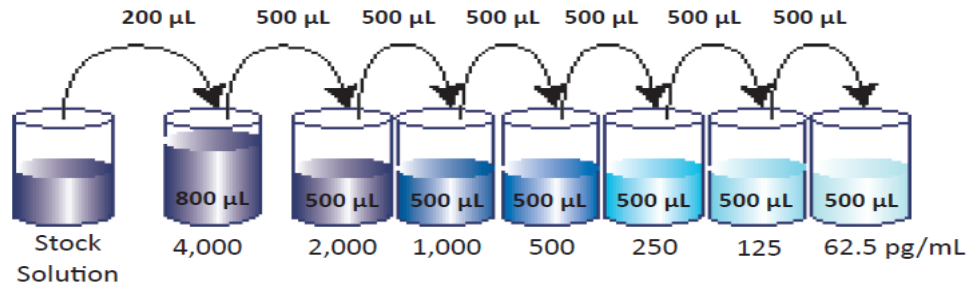
Menggunakan marker dari Biolegend Elisa Max<sup>TM</sup> Elisa Kit with Precoated Plates Human IL-23 Cat. No. 435407 (1 plates)

a. Persiapan sampel

- 1) Sampel darah yang telah diambil pada pembuluh vena lengan dengan menggunakan spuit sebanyak 6cc
- 2) Darah dimasukkan kedalam tabung penampung darah (*vacutainer*) EDTA langsung setelah darah diambil dan difiksasi di dalam coolbox. dan dijauhkan dari ice gel.
- 3) Lakukan sentrifugasi pada 1500 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan plasma (supernatannya) dilakukan oleh analis Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang

b. Langkah – langkah pemeriksaan

- 1) Sampel diambil dari darah vena di lengan responden yang dilakukan oleh peneliti, dan sentrifugasi dilakukan oleh analis dari Laboratorium Parasitologi Universitas Brawijaya
- 2) Pemeriksaan kadar IL-23 dengan menggunakan Human IL-23 Immunoassay Cat. No. 435407 Merk Biolegend
- 3) Prosedur pemeriksaan sebagai berikut :
  - a) Disiapkan semua reagent dan sampel (disuhu ruangan sebelum digunakan,  $\pm$  15 menit sebelum penggunaan, apabila ada kristal perlu dicairkan)
  - b) Disiapkan Human IL-23 standart dengan penambahan Assay Buffer A as the diluent., sesuai gambar berikut :



**Gambar 4.2 Gambar pengenceran *Standard* IL-23**

- c) Disiapkan Human IL-23 Kit Control + 1mL deionized or distilled water, divortex
- d) Disiapkan mikropate strips, yg tidak digunakan diambil dari frame dan dikembalikan dalam pax (lalu dibuat roadmap untuk ELISA)
- e) Ditambahkan 50 µL Matrix A pada setiap well
- f) Ditambahkan 150 µL of standard dilutions atau sampel pada setiap well (sesuai dengan peta). Mix dengan cara digoyang pelan 1 menit, ditutup strips, diinkubasi selama 2 jam, RT dan di shaker
- g) Disiapkan Wash Buffer  
untuk 1 plate = 20 mL wash buffer consentrat harus ditambah deionized atau destilat water untuk membuat 500 mL wash buffer
- h) Dibuang konten, dicuci per well menggunakan 400µL wash buffer, lalu cairan dibuang sempurna. Diulangi 4 kali
- i) Ditambahkan 100 µL of Human IL-23 Detection Antibody solution pada setiap well, ditutup strips, diinkubasi selama 2 jam, RT, dan di shaker
- j) Dibuang konten, dicuci per well menggunakan 400µL wash buffer, lalu cairan dibuang sempurna. Diulangi 4 kali
- k) Ditambahkan 100 µL Avidin-HRP A solution pada setiap well, ditutup strips, diinkubasi selama 30 menit, RT, dan di shaker

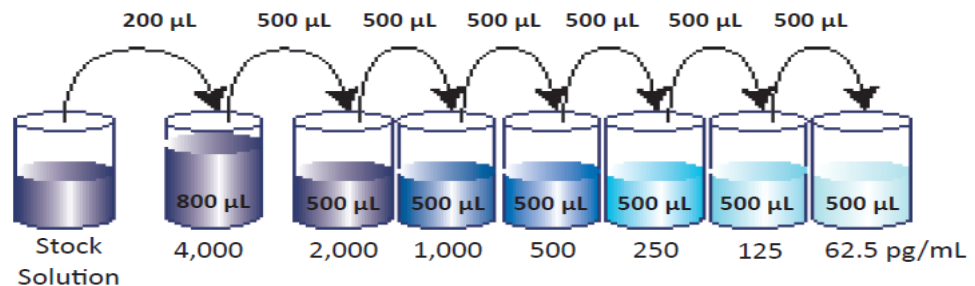
- l) Dibuang konten, dicuci per well menggunakan 400µL wash buffer, lalu cairan dibuang sempurna. Diulangi 5 kali
- m) Ditambahkan 100 µL Substrate Solution F pada setiap well, ditutup strips, diinkubasi selama 30 menit dalam ruangan tanpa cahaya, RT
- n) Ditambahkan 100 µL stop solution pada setiap well, mix secara perlahan
- o) Dibaca pada elisa reader sebelum melebihi 30 menit pada  $\lambda$  450 nm dan 570 nm.

#### **4.8.2 Pemeriksaan Kadar IL-22**

Menggunakan marker dari Biolegend Elisa Max<sup>TM</sup> Elisa Kit with Precoated Plates Human IL-22 Cat. No. 434507 (1 plates)

- a. Persiapan sampel
  - 1) Sampel darah yang telah diambil pada pembuluh vena di lengan dengan menggunakan spuit sebanyak 6cc akan segera dimasukkan ke dalam
  - 2) Darah dimasukkan kedalam tabung penampung darah (*vacutainer*) dan dijauhkan dari es secara langsung. setelah darah diambil dan difiksasi di dalam vacutainer.
  - 3) Lakukan sentrifugasi pada 1500 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan plasma (supernatannya) dilakukan oleh analis Laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang
- b. Langkah – langkah pemeriksaan
  - 1) Disiapkan semua reagent dan sampel (disuhu ruangan sebelum digunakan,  $\pm$  15 menit sebelum penggunaan, apabila ada kristal perlu dicairkan)
  - 2) Disiapkan mikroplate strips, yg tidak digunakan diambil dari frame dan dikembalikan dalam pax (lalu dibuat roadmap untuk ELISA)

- 3) Disiapkan Human IL-22 standart dengan penambahan Assay Buffer A as the diluent., sesuai gambar berikut :

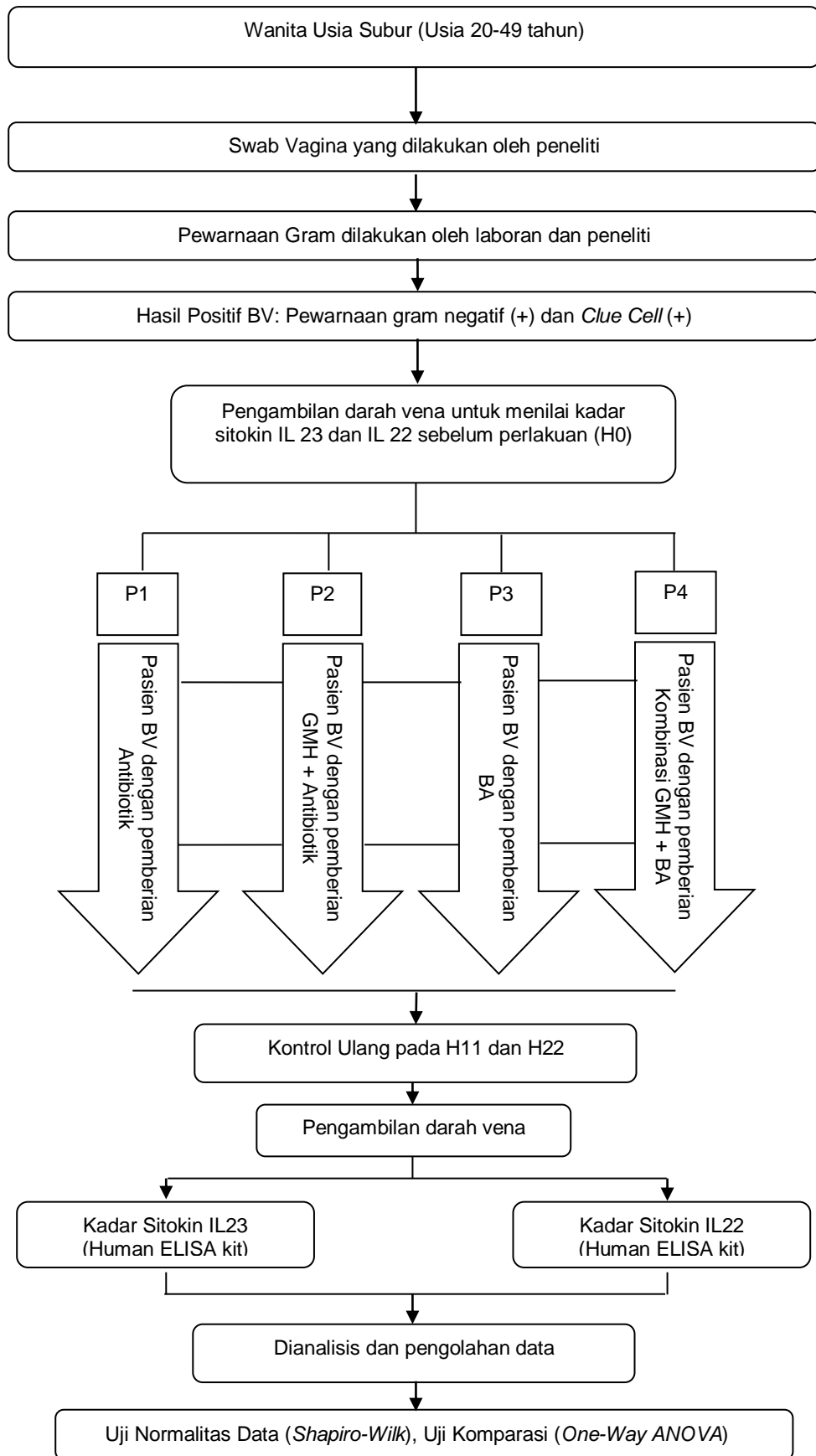


**Gambar 4.2 Gambar pengenceran *Standard* IL-22**

- 4) Cuci plate sebanyak 4x dengan menggunakan 300 µL wash buffer setiap well dan buang residunya dengan dibalik di atas kertas tissue.
- 5) Masukkan 50 µL Assay Buffer A ke dalam masing- masing well
- 6) Tambahkan 50 µL Standard Dilutions atau sample ke dalam well dan tutup dengan sealer. Inkubasi dilaam suhu ruang selama 2 jam dan shaking dalam 200 rpm
- 7) Disiapkan Wash Buffer  
untuk 1 plate = 20 mL wash buffer consentrat harus ditambah deionized atau destilat water untuk membuat 500 mL wash buffer
- 8) Dibuang konten, dicuci per well menggunakan 1xwash buffer, lalu cairan dibuang sempurna. Diulangi 4 kali
- 9) Ditambahkan 100 µL of Human IL-22 Detection Antibody solution pada setiap well, ditutup strips, diinkubasi selama 1 jam, RT, dan di shaker
- 10) Dibuang konten, dicuci per well menggunakan 400µL wash buffer, lalu cairan dibuang sempurna. Diulangi 4 kali
- 11) Ditambahkan 100 µL Avidin-HRP B solution pada setiap well, ditutup strips, diinkubasi selama 30 menit, RT, dan di shaker
- 12) Dibuang konten, dicuci per well menggunakan 400µL wash buffer, lalu cairan dibuang sempurna. Diulangi 5 kali

- 13) Ditambahkan 100  $\mu$ L Substrate Solution F pada setiap well, ditutup strips, diinkubasi selama 10 menit dalam ruangan tanpa cahaya, RT
- 14) Ditambahkan 100  $\mu$ L stop solution pada setiap well, mix secara perlahan
- 15) Dibaca pada elisa reader sebelum melebihi 30 menit pada  $\lambda$  450 nm dan 570 nm.

#### 4.9 Alur Penelitian



**Gambar 4.4 Alur Penelitian**

#### **4.10 Analisa Data**

Pada penelitian ini teknik analisis data dilakukan uji normalitas terlebih dahulu dengan menggunakan uji *Shapiro – Wilk* sedangkan uji komparasinya menggunakan Uji Komparasi (*One Way ANOVA*). Semua perhitungan analisis data tersebut menggunakan software *SPSS for Windows 23*.

##### **4.10.1 Uji Prasyarat Parametrik**

Untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan maka dapat dipilih dengan pendekatan uji statistik yang digunakan yaitu uji statistik parametrik. Dan sebelum dilakukan analisis data dengan menggunakan uji pada statistik parametrik maka data akan dianalisis terlebih dahulu dengan uji prasyarat parametrik yaitu data sampel dari variabel terukur diuji terlebih dahulu apakah data tersebar atau berdistribusi normal. Jika p-value menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikan  $\alpha = 0.05$  maka dapat ditarik kesimpulan bahwa data berdistribusi normal sehingga uji parametrik dapat digunakan (Sugiyono, 2012).

##### **4.10.2 Uji Komparasi *One Way ANOVA***

ANOVA atau *Analysis of Varian* digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata untuk lebih dari dua kelompok sampel yang tidak berhubungan. Jika ada perbedaan, rata-rata manakah yang lebih tinggi. Data yang digunakan biasanya berskala interval atau rasio (Duwi, 2011). Sedangkan untuk *One Way ANOVA* menurut Sudjana (1996), data yang di analisis menggunakan varians dan data hasil pengamatan merupakan pengaruh satu faktor. Dari tiap populasi secara independen diambil sebuah sampel acak, berukuran  $n_1$  dari populasi kesatu,  $n_2$  dari populasi kedua dan seterusnya berukuran  $n_k$  dari populasi ke  $k$ . Data sampel akan dinyatakan dengan  $Y_{ij}$  yang berarti data ke- $j$  dalam sampel yang diambil dari populasi ke- $i$ . (AZ, 2015)